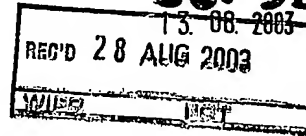


Rec'd PCT/PTO 07 JAN 2005

PCT/EP 03 / 07 27 C

10/520580



ROYAUME DE BELGIQUE



Il est certifié que les annexes à la présente sont la copie fidèle de documents accompagnant une demande de brevet d'invention tels que déposée en Belgique suivant les mentions figurant au procès-verbal de dépôt ci-joint.

Bruxelles, le -4.-8-2003

Pour le Directeur de l'Office
de la Propriété industrielle

Le fonctionnaire délégué,

S. MISSOTTEN
conseiller adjoint



**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



ADMINISTRATION DE LA POLITIQUE COMMERCIALE
Office de la Propriété Industrielle

N° 2002/0128

Aujourd'hui, le 8/7/2002

à Bruxelles,

14

heures

45

minutes

M

d'Oosterlynck André

agissant en tant que ☒ Demandeur.

☐ Employé du demandeur.

☐ Employé d'un établissement effectif du demandeur.

☐ Mandataire agréé.

☐ Employé du mandataire agréé, M

☐ Avocat.

Se présente à l'OFFICE DE LA PROPRIETE INDUSTRIELLE et y dépose une demande en vue d'obtenir un brevet d'invention relatif à : L'USAGE DE LA FARINE RAFFINEE ET DESHUILEE DU JOJOBA OU UN OU PLUSIEURS DE SES COMPOSANTS BIO-ACTIVES COMME AGENT INHIBITEUR DE L'ANGIOGENESE DANS LA LUTTE CONTRE LE CANCER.

demandé par D'OOSTERLYNCK ANDRE
Museumlaan, 17
9831 SINT-MARTENS-LATEM

La demande, telle que déposée, contient les documents nécessaires pour obtenir une date de dépôt conformément à l'article 16, paragraphe 1^{er}, de la loi du 28 mars 1984 sur les brevets d'invention.

Le déposant,

Le fonctionnaire délégué,

S. DRAISQUE
INGENIEUR

Bruxelles, le 8/7/2002

L'usage de la farine raffinée et déshuillée du Jojoba ou un ou plusieurs de ces composants bio-actives comme agent inhibiteur de l'angiogenèse dans la lutte contre le cancer.

5 **Spécification**

L'invention concerne essentiellement une nouvelle application de la farine raffinée et déshuillée des graines de la plante de Jojoba (*Simmondsia chinensis* L., C.K. Schneider), ou d'une des substances bio-actives qui en ont été isolées comme un produit inhibant l'angiogenèse ou un produit antitumoral (anticancéreux) pour l'homme et l'animal.

10

Etat de l'art

La préparation de la farine raffinée et déshuillée du Jojoba a été décrite en particulier dans le brevet international d'application WO 94/25035. L'extrait polaire de cette farine raffinée et déshuillée du Jojoba est constitué majoritairement de Simmondsin et de ses analogues et dérivés dont nous avons révélé les caractéristiques inhibitives sur l'angiogenèse.

15

Aspects principaux de l'invention

L'invention concerne la découverte inattendue du fait que l'extrait polaire de la farine raffinée et déshuillée du Jojoba ou les substances bio-actives qui en sont isolées, à savoir la Simmondsin, ses analogues et dérivés, produisent un effet potentiel sur l'inhibition de l'angiogenèse et ainsi un effet antitumoral sur les tumeurs dépendant de l'angiogenèse. Le phénomène de l'angiogenèse consiste dans la nouvelle formation de vaisseaux sanguins (neo-vascularisation). Ce phénomène est d'une importance particulière dans les métastases des cancers tumoraux comme par exemple: la tumeur de la prostate, le carcinome du poumon, le carcinome du sein...

20

25

Les médecins spécialisés reconnaissent que les tumeurs dépendant de l'angiogenèse représentent une large part des cancers existants, ce qui démontre l'importance de cette invention. En effet, les tumeurs produisent des facteurs angiogéniques qui stimulent la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. L'inhibition du développement des vaisseaux sanguins empêchera le transfert de l'énergie vers la tumeur, ce qui causera l'arrêt de son développement et, de ce fait, provoquera le début de sa régression. Pour cela, la recherche d'un inhibiteur de l'angiogenèse utilisable dans la pratique est de

35

Objectifs de l'invention

La présente invention a comme objectif principal le développement d'une nouvelle composition pharmaceutique qui disposera d'un effet inhibiteur sur l'angiogenèse ou d'un effet antitumoral agissant en particulier sur les tumeurs dépendant du phénomène de l'angiogenèse.

40

Description détaillée de l'invention

Suivant un premier aspect, cette invention est liée à l'usage de la farine raffinée et déshuillée de Jojoba, ou d'un extrait polaire, ou d'une substance bio-active isolée de cet extrait, c.a.d. la Simmondsin, ses analogues et dérivés, comme un agent inhibiteur de l'angiogenèse ou un agent antitumoral, pour la fabrication d'une composition pharmaceutique ayant une activité inhibitrice de l'angiogenèse ou un effet antitumoral.

45

Selon une deuxième conception, cette invention est liée à une composition pharmaceutique, caractérisée par un agent inhibiteur de l'angiogenèse et comportant la farine raffinée et déshuilée du Jojoba, ou un extrait polaire, ou une substance bio-active isolée de cet extrait – en particulier la Simmondsine, - un de ses analogues ou dérivés – dans une dose efficace pour inhiber l'angiogenèse chez l'homme et l'animal.

Troisièmement, cette invention se rattache à une méthode d'inhibition de l'angiogenèse chez l'homme et l'animal: elle consiste à administrer aux humains et aux animaux qui en sont réduits à ce traitement, une dose efficace afin d'inhiber l'angiogenèse. Celle-ci se composerait de l'extrait polaire de la farine raffinée et déshuilées du Jojoba ou d'une substance bio-active isolée de cet extrait, comportant en particulier la Simmondsine, ses analogues et dérivés.

Selon un autre principe, les substances bio-actives, à savoir la Simmondsine, ses analogues et dérivés. Les produits de synthèse comprenant une fonction nitrilique sans hydrogène disponible sur un carbone voisin empêchant ainsi la libération de l'acide cyanique toxique sont inclus dans l'inhibition de l'angiogenèse.

De la présente description il résulte que cette invention impliquera une avance technique inattendue et bien déterminée permettant de traiter les tumeurs par ses qualités inhibitrices de l'angiogenèse voir ses propriétés antitumorales.

Un autre usage de cette composition pharmaceutique est le traitement des tumeurs humaines et animales, en particulier celles dépendant de la néo-vascularisation, par exemple la tumeur de la prostate, le carcinome du poumon, le carcinome du sein, le carcinome de la peau (mélanome)... etc.

Cette invention, sera décrite en référant aux exemples descriptifs qui ne limitent pas la protection de l'invention. Il sont seulement donné à l'attention des spécialistes à effectuer le traitement. Dans ces exemples, tous les pourcentages sont donnés en poids, la température est la température ambiante et la pression est la pression atmosphérique, sauf indication contraire.

Administration orale

Suivant une conception particulière, la farine raffinée et déshuilée du Jojoba, l'extrait polaire ou une de ses substances bio-actives isolées de la se conçoivent pour l'administration par voie orale chez l'homme et l'animal.

Suivant une autre conception particulière, cette composition pharmaceutique est conçue pour l'administration orale et contient de la farine raffinée et déshuilée du Jojoba dans une concentration inférieure à 3 pour cent en poids. L'administration s'effectue p.e. comme 'un milk-shake' à prendre durant les repas principaux.

Suivant une autre conception particulière, cette composition pharmaceutique a été conçue pour l'administration orale et contient l'extrait polaire de la farine raffinée et déshuilée du Jojoba, ou un de ses substances bio-actives, en particulier la Simmondsine, ses analogues et dérivés, dans une concentration inférieure à 0,15 pour cent en poids. L'administration s'effectue ou comme un milk-shake, ou comme d'un comprimé contenant la dose exacte de la molécule bio-active, à prendre durant les repas.

L' administration parentérale

Suivant une autre conception particulière, l'extrait polaire ou un de ses composants bio-actives est conçu pour l'administration parentérale chez l'homme et l'animal.

- 5 Suivant une autre conception, l'extrait polaire ou un des ses composants se conçoit pour l'administration parentérale (pour le traitement parentéral) et comporte un extrait polaire de la farine raffinée et déshuillée du Jojoba ou une substance bio-active isolée de cet extrait, en particulier la Simmondsine, ses analogues et dérivés, dans une concentration inférieure à 0,15 pour cent en poids.

10

L' administration topique

Suivant une conception individuelle, l'extrait polaire ou un de ses composants conçu pour le traitement topique des tumeurs accessibles par la voie topique sur la peau de l'homme et l'animal.

15

- Suivant une autre conception de l'usage de l'extrait polaire est celle de l'administration topique. Il s'agit de l'extrait polaire de la farine raffinée et déshuillée du Jojoba ou d'une substance bio-active isolée de cet extrait qui contient en particulier la Simmondsine, ses analogues et dérivés, dans une concentration entre 0.1 et 10 pour cent en poids, de préférence 5 pour cent en poids de l'extrait polaire ou un de ces constituants.

20

Exemple 1: Préparation de la farine raffinée et déshuillée du Jojoba

Les graines de Jojoba disponible sur le marché, sont fragmentées et aplaties de façon à obtenir la farine de jojoba qui contient de l'huile et des fragments de pelures. Les pelures sont séparées par voie mécanique. La farine contenant l'huile est traitée par une extraction aux solvants pour éliminer l'huile comme décrit dans le brevet US N° 5.672.731, donnant ensuite la farine raffinée et déshuillée du Jojoba (E1)

25

Exemple 2: Préparation de l'extrait polaire de la farine raffinée et déshuillée du Jojoba

30

- La farine raffinée et déshuillée du Jojoba comme décrite dans l'exemple 1, est extraite par un solvant polaire par exemple un cétone, à savoir l'acétone, le méthyle éthyle cétone, ou un alcool avec une point de ébullition bas, à savoir l'éthanol ou le méthanol avec un ajoute d'eau à fin d'augmenter la polarité du solvant. La durée de l'extraction dépend de la température du fonctionnement. Si l'on travaille à la température de reflux, la durée de l'extraction s'élève de quelques minutes jusqu'à une heure, ce qui suffit pour isoler l'extrait polaire qui contient les substances bio-actives.

35

- Ensuite, l'extrait polaire est évaporé sous vide pour éliminer le solvant, le résidu est ensuite séché par lyophilisation.

40

- Le produit lyophilisé (E2) obtenu, comporte en majeure partie la Simmondsin, ses analogues et dérivés présents naturellement dans les graines de jojoba, et constitue une deuxième conception de cette invention. La composition E2 est soumise aux expériences biologiques comme décrites dans l'exemple 5.

45

L' agent inhibiteur de l'angiogenèse peut constituer une composition pharmaceutique seule ou en soi, ou peut être mélangé dans un support ou excipient pharmaceutique adapté à la voie d'administration.

Cette voie peut être une voie orale, topique ou parentérale (intraveineuse, intramusculaire ou subcutanée) sans limitation.

Exemple 3

- 5 Une composition pharmaceutique comportant une ou plusieurs substances bio-actives isolées de l'extrait polaire comme préparée dans l'exemple 2

1) Première étape: isolation des substances bio-actives.

- 10 L'extrait polaire comme obtenu dans l'exemple 2 est soumis ensuite à une série d'opérations d'extractions liquide/liquide ou solide/liquide utilisant des solvants avec un pouvoir solvant variable (gradient ou isocratic). Ainsi, 4 groupes des molécules principales sont isolés et sont présent dans l'extrait polaire comme décrit dans l'exemple 2; à savoir:

- 15 • Un groupe de 5 sucres: d-glucose, mannose, galactose, xylose et arabinose
- Le groupe des Simmondsins: Simmondsin (majeur), Desméthyl Simmondsin (2 isomères) et Didesméthyl Simmondsin.
- Le groupe des Simmondsin Ferulés: Ferulés (cis/trans) de la Simmondsin, Desméthyl Simmondsin et Didesméthyl Simmondsin.
- 20 • Le groupe des Ferulés de sucre sous le nom de d-glucose ferulés.

En référant aux résultats en annexe, les molécules avec la bio-activité la plus haute au niveau de l' inhibition de l'angiogenèse sont retrouvées dans le groupe de Simmondsin et/ou les Simmondsin Ferulés(cis/trans). Notons à partir des résultats biologiques que la Simmondsin est moins active que l'extrait polaire total de l'exemple 2, ce qui est inattendu.

L' isolation et l'identification de la molécule la plus active (E3) est en cours d'examen.

- 30 2) Deuxième étape: Préparation d'une composition pharmaceutique
Le produit lyophilisé (E2 ou E3) qui constitue l'agent inhibiteur de l'angiogenèse peut se constituer en soi ou peut être mélange dans un support ou excipient pharmaceutique adapté pour la voie d'administration. Celle-ci peut être orale, topique ou parentérale sans limitation.

Exemple 4

- 1) Isolation de la Simmondsin de l'extrait polaire obtenu dans l'exemple 2 (E.2)

La Simmondsin est isolée par cristallisation à partir de l'extrait polaire avant l'élimination du solvant de l'E2. Cette séparation par cristallisation est facile à exécuter. En général, l'extrait polaire est laissé dans des conditions de conservation qui permettent l'évaporation du solvant. Durant l'évaporation du solvant, la saturation de la Simmondsin (majeur) commence et la formation des cristaux de Simmondsin s'ensuit. La séparation physique des cristaux se fait par exemple par filtration.

Les cristaux de Simmondsin obtenus de cette façon constituent le produit E4 décrit dans la 4ième pensée conception. C' est-à-dire, le produit d'invention inhibiteur de l'angiogenèse ce qui est soumis aux expériences biologiques dans l'exemple 5.

- 2) Une composition pharmaceutique peut être préparée à partir des cristaux de Simmondsin dans des concentrations différentes dépendant de la voie d'administration utilisée.

5 Quand il s'agit d'une composition pharmaceutique à administration orale, la concentration de 0.01 à 0.15 pour cent en poids est proposée, p.e. à administrer sous forme d'une pilule pendant les principaux repas.

10 Quand il s'agit d'une composition pharmaceutique à administration topique sur la peau, la concentration des cristaux de Simmondsin peut varier entre 0.1 et 15 pour cent en poids, de préférence 5 pour cent en poids de la composition pharmaceutique.

Exemple 5

15 Expériences biologiques sur les effets inhibiteurs de l'angiogenèse des différents produits de l'invention E1 jusqu'à E4 suivant les conceptions présentées dans les exemples 1 jusqu'à 4.

Expériences biologiques ont été faites comme suit :

Protocole de test: Chorion Allantois Membrane Assay (CAM assay).

20 Des œufs de poules fertilisées sont incubés durant 4 jours à 40°C. Puis, les coques sont ouvertes pour exposer le CAM. Deux à 3 ml d'albumine sont enlevés pour diminuer la pression sur le CAM, (ceci rend le CAM plus facile à manipuler). L'orifice est fermé avec du scotch cellophane et les œufs sont incubés de nouveau jusqu'au neuvième jour.

25 Puis, on applique les composants bio-actifs de test sous une forme liquide, utilisant des concentrations différentes.

L'extrait polaire total (E2) qui contient tous les composants bio-actifs est utilisé comme référence, les composants individuels (E3) de cet extrait sont comparé au niveau de leur activité biologique avec l'activité de l'extrait polaire totale. Chaque composant à tester est solubilisé et 'pipeté sur un disque transmis stérile en plastic (10 mm²), puis séché sous des conditions stériles'. Chaque disque est traité avec l'acétate de cortisone (100 µg/ 50 µl) pour éviter des réactions inflammatoires. Après séchage, les disques sont placés sur le CAM, avec le côté chargé contre le CAM. Le disque de contrôle est placé à une distance de 1 cm du disque qui contient le composant à tester. L'orifice est refermé avec le scotch cellophane et les œufs sont incubés de nouveau. Au jour 11, le scotch et les disques sont enlevés, et 10% de formol est pulvérisé sur le CAM. Les œufs doivent ensuite sécher durant 2 à 4h à la température ambiante. Après, le CAM est coupé de l'œuf et monté sur une lame microscopique. La densité vasculaire est mesurée selon la méthode de Harris-Hooker; Tous les micro-vaisseaux qui croisent 3 cercles concentriques d'un diamètre de 6, 8 et 10 mm sont comptés (voir figure).

40 L'Index d'Angiogenèse (IA) est exprimé suivant la formule $\{(t/c) \times 100\} - 100$, dont t = le nombre total des vaisseaux croisant la zone où le disque contenant le composant à tester a été localisé; et c = le nombre total des vaisseaux croisant là où le disque de contrôle a été localisé. Le composant de test est classé positif quand le IA > 10% et négatif quand
45 IA < 10%. Quand IA se trouve entre - 10% et + 10%, il n'y pas d'effets attribués au composant de test.

Commentaire sur les résultats obtenu

50 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) était utilisé comme contrôle négatif, pendant que le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) était utilisé comme

contrôle positif (stimulant de l'angiogenèse). Une différence importante ($p < 0.05$) était trouvée entre les contrôles positif et négatif. Comparé avec le contrôle négatif, l'extrait polaire total (E2) de la farine raffinée et déshuillée du Jojoba démontre un effet significatif inhibiteur sur l'angiogenèse.

- 5 La Simmondsin (E4) démontre aussi un effet significatif inhibiteur sur l'angiogenèse néanmoins moins fort que l'extrait polaire totale (E2). De plus, l'extrait polaire total et la Simmondsin avaient la propriété d'éliminer l'activité capable d'éliminer l'activité stimulante du VEGF (voir les résultats du CAM en annexe).
- 10 Des résultats supplémentaires seront complétés endéans les 6 mois.

Références:

- 15 • Liekens S., Neyts J., Degreëve B. and De Clercq E. (1997) The sulfonic acid polymers PAMPS and related analogues are highly potent inhibitors of angiogenesis. *Oncology research*, 9:173-181
- Haris-Hooker S.A., Cajdusek C.M., Wight T.N., Schwartz S.M. (1983) Neovascular responses induced by cultured aortic endothelial cells. *J. Cell Physiol.* 114:302-310
- 20 • Van Hinsbergh V.W., Collen A., Koolwijk P. (1999) Angiogenesis and anti-angiogenesis: perspectives for the treatment of solid tumors. *Ann. Oncol.* 1999.10(Suppl 4):60-63)

Revendications:

- 5 1. L'usage de la farine raffinée et déshuillée du Jojoba ou des substances bio-actives qui en sont isolées par extraction polaire, à savoir la Simmondsin, ses analogues et dérivés comme un agent inhibiteur de l'angiogenèse ou anti-tumorale, qui permet la fabrication d'une composition pharmaceutique avec des caractéristiques inhibiteur sur l'angiogenèse ou anti-tumorale.
- 10 2. Suivant la revendication n°1, la concentration de la farine raffinée et déshuillée du Jojoba est administrée à 3 pour cent en poids ou moins.
3. Suivant la revendication n°1, la concentration de l'extrait polaire ou d'un de ces constituants, de la farine raffinée et déshuillée du Jojoba est administrée 0.15 pour cent en poids ou moins.
- 15 4. Suivant la revendication n°1 à 3, la composition pharmaceutique sert à traiter les tumeurs humaines et animales à savoir les tumeurs dépendant de la néo-vascularisation comme par exemple la tumeur de la prostate, le carcinome du poumon, le carcinome du sein, le carcinome de la peau (mélanome).
- 20 5. Une composition pharmaceutique avec la caractéristique qu'il s'agit de la farine raffinée et déshuillée du Jojoba ou des substances bio-actives isolées par extraction polaire, à savoir le Simmondsin, ses analogues et dérivés dans une dose effective pour inhiber l'angiogenèse chez les humains et animaux.
6. Suivant les revendications n°s 1, 3, 4 et 5, l'usage des substances bio-actives synthétisées contenant une fonction nitrilique sans hydrogène disponible sur un carbone voisin est également mis sous protection grâce à cette invention.
- 25 7. Suivant les revendications n°s 1 à 6, la composition pharmaceutique est formulée pour le traitement orale des tumeurs qui sont accessibles par la voie orale.
8. Suivant les revendication n°s 1, 3, 4, 5 et 6, la composition pharmaceutique est formulée pour l'administration parentérale pour le traitement des tumeurs qui sont accessible par la voie parentérale.
- 30 9. Suivant les revendications n°s 1, 3, 4, 5 et 6, la composition pharmaceutique est formulée pour l'administration topique pour le traitement des tumeurs de la peau qui sont accessibles par la voie topique.